

**Disclaimer:**

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

**Notes:**

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (\*\*\*\*).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 22:16:35 JST 07/01/2008

Dictionary: Last updated 05/30/2008 / Priority: 1. Chemistry / 2. Biotechnology / 3. Medical/Pharmaceutical sciences

---

**CLAIM + DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The manufacture method of the fats and oils containing the higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride characterized by making the lipase which acts only on 1 of triglyceride, and the ester bond like 3-act under existence of fats and oils and medium chain fatty acid.

[Claim 2] While making the fixed lipase which acts only on 1 of triglyceride, and the ester bond like 3-act and obtaining a reaction mixture under existence of fats and oils and medium chain fatty acid, immobilized enzyme is collected out of this reaction mixture. Next, by carrying out by repeating the process which newly add fats and oils and medium chain fatty acid, and said collected fixed lipase is made to act under existence of these fats and oils and this medium chain fatty acid, and obtains a reaction mixture The manufacture method of the fats and oils containing the higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride characterized by obtaining the fats and oils which contain higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride 95% or more.

[Claim 3] The manufacture method of the fats and oils containing higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride according to claim 1 whose medium chain fatty acid is what is chosen from the fatty acid which has 6-12 carbon numbers.

[Claim 4] The manufacture method of fats and oils that the medium chain fatty acid which has 6-12 carbon numbers contains higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride according to claim 3 which is caprylic acid or capric acid.

[Claim 5] The manufacture method of fats and oils that a higher unsaturated fatty acid contains higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride according to claim 1 which is arachidonic acid, docosa-hexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, or these combination.

[Claim 6] The manufacture method of fats and oils that fats and oils contain the higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride according to claim 1 extracted from fish oil,

a krill, algae, or a fungus.

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the manufacture method of the triglyceride which contains a higher unsaturated fatty acid in high concentration.

[0002]

[Description of the Prior Art] The bioactive which a higher unsaturated fatty acid has attracts attention in recent years. It is eicosapentaenoic acid (the following "EPA" is called) in particular. Docosa-hexaenoic acid (the following "DHA" is called) Having many bioactive operations, such as a preventive effect over adult diseases, such as arteriosclerosis and thrombosis, and a \*\* Gand operation, potentiation of learning ability, is known. And various examination about the directions to the drugs of EPADHA and a food for specified health use is made.

[0003] As how to condense the higher unsaturated fatty acid which made EPA and DHA the subject, For example The method and (2) which are depended on (1) chromatograph The method and (3) which are depended on liquid-liquid distribution The method and (4) which are depended on vacuum precision distillation The method of depending on the addition product to a double bond and the method which combined these are known (\*\* Nobuo: the bottom of food stuff industry and 9, 30 (1985)). However, in order to condense a higher unsaturated fatty acid by these methods, fats and oils can be changed into fatty acid, or it is necessary to change into the alkali metal salt or lower alcohol etc., and food cannot be presented with these.

[0004] As how to condense a higher unsaturated fatty acid with the form of the glyceride with which food can be presented, Very-low-temperature solvent fractionation (winterization) (\*\* Nobuo: the bottom of food stuff industry and 9, 30 (1985)), and the alternative hydrolyzing method using lipase (JP,H4-16519,B) It is known. However, at very-low-temperature solvent fractionation, it is optimal temperature (-30-50 degree C) very much. It is necessary to crystallize and filter, moreover a solvent must be removed, and a process is complicated. Moreover, sardine oil with EPA(s) abundant in very-low-temperature solvent fractionation (8 to 16% of EPA content) When it uses as stock oil, The maximum concentration rate of EPA is a tuna with DHA(s) are 30% and abundant, or a bonito eye socket oil (25 to 30% of DHA content). When it is considered as a raw material, the maximum concentration rate of DHA is 35%.

[0005] Thus, when condensing EPA, DHA, etc. to high concentration by very-low-temperature solvent fractionation, there is a problem that the yield of the higher unsaturated fatty acid glyceride obtained is as low as 15% or less, and a production cost becomes very high.

Moreover, the method using the alternative hydrolysis reaction of lipase, i.e., the lipase which *Candida SHIRINDORASHIE* (*Candida cylindracea*) produces, is used. How to hydrolyze fish oil and condense a higher unsaturated fatty acid in glyceride (JP,H4-16519,B) In the case where it uses, although DHA concentration can be condensed to 50 to 55%, EPA has the inconvenience that it cannot condense. And even DHA which cannot receive a hydrolysis easily will lose 30 to 35% of the amount of DHA(s) before a reaction as free fatty acid, when a reaction reaches an equilibrium. Furthermore, there are a recovery of glyceride and a problem that 30 to 35% and the diglyceride whose fusing point it becomes and is low and is high carry out subraw.

[0006] Therefore, the method of manufacturing the triglyceride which contains a higher unsaturated fatty acid in high concentration is demanded, without lessening loss of higher unsaturated fatty acids, such as DHA, and carrying out subraw [ of the diglyceride ] conventionally. Until now At least 1 of triglyceride and 3- use the ester exchange reaction by specific lipase. The fats and oils which consist of 14 medium chain fatty acid, linolic acid which is fatty acid of 18 or more carbon numbers, linolenic acid, arachidonic acid, and EPADHA are used as a raw material from a carbon number 8. The manufacture method of the fats and oils which contain medium chain fatty acid at least in 2- of triglyceride, and contain fatty acid of 18 or more carbon numbers at least in 1 and 3- is known. (JP,S63-27988,A) .

[0007] Moreover, the manufacture method of triglyceride that at least 1 and 3- uses fish oil and oleic acid as a raw material, contains oleic acid at least in 1 and 3- using the ester exchange reaction which used specific lipase, and contains DHA at least in 2- is also known (JP,H6-587594,A). . However, it is with a method given in JP,H6-587594,A, Since the oleic acid used for an ester interchange is equivalent to the average molecular weight of composition fatty acid of fish oil, the DHA content in glyceride (weight %) cannot be raised, and the triglyceride content in formed oil fat is about 90%, and is not so high. Moreover, there is a problem that DHA cannot fully be condensed, by a method given in JP,S63-27988,A.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention aims at offering the manufacture method of the fats and oils containing the triglyceride which raised the higher unsaturated fatty acid content (weight %).

[0009]

[Means for Solving the Problem] This invention persons are carrying out the ester interchange of the long chain fatty acid which constitutes at least 1 of triglyceride, and 3- to medium chain fatty acid, as a result of inquiring wholeheartedly based on the above-mentioned technical problem. It succeeds in manufacturing the glyceride which contains the higher unsaturated fatty acid which exists at least in 2- in high concentration, and came to complete this invention. That is, this invention is the manufacture method of the fats and oils containing the higher

unsaturated fatty acid quantity content triglyceride characterized by making the lipase which acts only on 1 of triglyceride, and the ester bond like 3-act under existence of fats and oils and medium chain fatty acid.

[0010] Furthermore, this invention collects immobilized enzyme out of this reaction mixture while it makes the fixed lipase which acts only on 1 of triglyceride, and the ester bond like 3-act and obtains a reaction mixture under existence of fats and oils and medium chain fatty acid. Next, by carrying out by repeating the process which newly add fats and oils and medium chain fatty acid, and said collected fixed lipase is made to act under existence of these fats and oils and this medium chain fatty acid, and obtains a reaction mixture. It is the manufacture method of the fats and oils containing the higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride characterized by obtaining the fats and oils which contain higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride 95% or more.

[0011] It is chosen out of the fatty acid which has 6-12 carbon numbers as medium chain fatty acid here, and caprylic acid or capric acid is mentioned, for example, as a higher unsaturated fatty acid. For example, arachidonic acid, docosa-hexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, or these combination are mentioned, and what was extracted from fish oil, a krill, algae, or a fungus is mentioned as fats and oils, for example.

[0012] This invention which explains this invention in detail is carrying out the ester interchange of the long chain fatty acid which constitutes at least 1 of triglyceride of fats and oils, and 3- to medium chain fatty acid hereafter. It is the method of manufacturing the triglyceride which the content ratio of the higher unsaturated fatty acid which exists at least in 2- was raised [triglyceride], and made high concentration containing this higher unsaturated fatty acid. Namely, this invention uses as a raw material one or more kinds of medium chain fatty acid and a little water which are chosen from 12 fatty acid from fats and oils and a carbon number 6. It is the method of manufacturing the triglyceride at least 1 and 3- made specific lipase acting, performed the ester exchange reaction, and collected efficiently higher unsaturated fatty acids, such as DHA, EPA, etc. which are contained at least in 2- in triglyceride, with the mold of triglyceride and with which it raised higher unsaturated fatty acid concentration.

[0013] The average molecular weight of the fatty acid which constitutes triglyceride of stock oil fat is equivalent to the molecular weight of fatty acid of a carbon number 18. In this invention, the concentration of the higher unsaturated fatty acid which exists at least in 2- can be raised by making small the molecular weight of the fatty acid which carries out the ester interchange of the long chain fatty acid which constitutes at least 1 of triglyceride, and 3- to medium chain fatty acid, and exists at least in 1 and 3-. As medium chain fatty acid used for an ester interchange, it is desirable that it is 12 medium chain fatty acid from a carbon number 6, and ten medium chain fatty acid is still more desirable from a carbon number 8.

[0014] In this invention, fats and oils mean the triglyceride which contains a higher unsaturated fatty acid in composition fatty acid. As higher unsaturated fatty acid content fats and oils, a krill besides fish oil, such as a tuna, a bonito, a sardine, Sabah, a Pacific saury, Tara, a cuttlefish, and a horse mackerel, and the fats and oils further extracted from fungi, such as algae, such as chlorella and Spirulina, and Mortierella, can be mentioned, for example. Moreover, as a higher unsaturated fatty acid, arachidonic acid, DHA, EPA(s), or these combination are mentioned, for example.

[0015] As lipase which can be used by this invention, a thing, the Buta pancreatic lipase, etc. which microorganisms, such as the Rhizopus (Rhizopus) group, a RIZOMU call (Rhizomucor) group, and an Aspergillus (Aspergillus group), produce are mentioned, for example. A commercial thing can be used about this lipase. for example, lipase (the Tanabe Seiyaku Co., Ltd. make --) of Rhizopus delemar (Rhizopus delemar) TARIPAZE, lipase of RIZOMU call MIIHEI (Rhizomucor miehei) (Novo Nordisk make; ribozyme IM), Lipase (Amano Pharmaceuticals; lipase A) of Aspergillus nigr (Aspergillus niger) etc. is mentioned.

[0016] The type of usage of the above-mentioned lipase may use the lipase which could use as it is and was fixed to cerite, an ion exchange resin, a ceramic carrier, etc. An ester interchange becomes difficult to advance, and when water is not included, the moisture content added to this system of reaction is very important, when there are many moisture contents, a hydrolysis takes place, and the recovery of glyceride falls. [ therefore, the moisture content when using immobilized enzyme ] 0 to 1,000% of the applied amount of enzymes (weight %) It is 10 to 500% (weight %) preferably. It is. Rhizopus delemar fixed to cerite or a ceramic carrier (Rhizopus delemar) The moisture content when using lipase (the Tanabe Seiyaku Co., Ltd. make, TARIPAZE) is 10-100 % (weight %) of the applied amount of enzymes.

[0017] Although not restricted [ that what is necessary is for a reaction condition just to determine the amount of the lipase used suitably ] in particular, when lipase of Rhizopus delemar fixed, for example in cerite or a ceramic carrier is used, 2.5 to 10% of a cocktail (weight %) is optimum dose. An ester exchange reaction is performed by the following methods. That is, a kind of 12 medium chain fatty acid and oleic acid, or linolic acid is added to the above-mentioned fish oil etc. from a carbon number 6. What is necessary is just to carry out for 10 to 70 hours, adding and agitating lipase and distilled water of a suitable quantity (usually 10,000 - 30,000 U/g) for this. The reaction temperature at this time is 20-40 degrees C.

[0018] A higher unsaturated fatty acid is triglyceride condensed by high concentration, and triglyceride after the reaction manufactured by this invention exists as a mixture of this triglyceride and the fatty acid which constitutes at least 1 of superfluous medium chain fatty acid and the fats and oils (for example, fish oil) which the ester interchange was carried out

and were produced, and 3-. [ then, refining of the triglyceride (it is called the following "higher unsaturated fatty acid concentration triglyceride") with which the higher unsaturated fatty acid was condensed by high concentration ] It can carry out by removing above-mentioned fatty acid and superfluous medium chain fatty acid by which the ester interchange was carried out by combining alkali deoxidation, steam distillation, molecular distillation, vacuum precision distillation, column chromatography, solvent extraction, or these.

[0019] Moreover, the content of higher unsaturated fatty acid concentration triglyceride can be raised to high concentration (95% or more) by repeating the above-mentioned ester exchange reaction and performing it. That is, the lipase which acts only on 1 of triglyceride and the ester bond like 3-under existence of medium chain fatty acid is made to act on fats and oils, and fatty acid like 1 and 3-obtains the reaction solution by which the ester interchange was carried out to medium chain fatty acid.

[0020] Next, collect immobilized enzyme (fixed lipase) from this reaction solution, next newly add fats and oils and medium chain fatty acid (water is not added), said fixed lipase is made to act under existence of these fats and oils and this medium chain fatty acid, and a reaction mixture is obtained. When there is little number of times of a reaction (for example, 1 - twice, etc.), the triglyceride content of the fats and oils obtained is just over or below 90%, but the fats and oils which contain higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride 95% or more are obtained by reacting repeatedly using immobilized enzyme.

[0021] In a Prior art, the triglyceride content in fats and oils to about 90 being% and not having been so high [ this invention ] Without activity falling, even if it repeats and uses immobilized enzyme, the activity is maintained and the fats and oils which contain higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride 95% or more (many are 99% or more) are obtained. It is possible to repeat, unless the number of times of a reaction in particular of the above-mentioned process for obtaining the fats and oils which contain higher unsaturated fatty acid quantity content triglyceride 95% or more is not limited, but lipase is deactivated and ester interchange ability falls. the bottom of the conditions of this invention -- 3-150 \*\*\*\*\* -- things are made.

[0022] About the enzyme used for a reaction, and a reaction condition, it is the same as that of the above. In order that the higher unsaturated fatty acid concentration triglyceride manufactured by this invention may not separate at all DHA contained at least in 2- of fish oil, for example, it is mentioned to the feature that the recovery of DHA is very good. [ many ] Furthermore, if the method raised by this invention is used, a hydrolysis of stock oil fat will hardly take place, but since only an ester exchange reaction advances, the recovery of fats and oils and the feature of being very high are mentioned.

[0023]

[Example] A work example explains this invention still more concretely hereafter. However, this

invention is not limited to these work examples.

[Work example 1] Tuna oil (saponification value: 184.5, EPA:5.8%, DHA:23.3%) [ 100 g ] One 100g kind in 12 medium chain fatty acid and oleic acid, or linolic acid is added from a carbon number 6. RIZOBUSU Dele Maher (Rhizopus delemar) fixed [ with cerite 545 (product made from Wako Pure Chem Industry) ] Lipase (the Tanabe Seiyaku Co., Ltd. make, TARIPAZE 15,000 U/g) 5g and 2.5ml of distilled water -- in addition -- while agitating at 500rpm The ester exchange reaction was performed at 30 degrees C for 16 hours.

[0024] The cocktail after an ester exchange reaction had reached the equilibrium enough. Subsequently, higher unsaturated fatty acid concentration glyceride was able to be obtained as follows by removing the free fatty acid and the superfluous medium chain fatty acid for which it was not exchanged of the fish oil origin which the ester interchange was carried out and was produced from this cocktail to a water layer by the alkali deoxidizing method. In addition, after methyl-ester-izing fatty acid composition in the obtained glyceride according to a conventional method, capillary column gas chromatography analyzed it.

[0025] Moreover, about a glyceride presentation, it is a sample to KUROMA lot S-III (Product made from YATORON). IYATORO scanning TH-10 after carrying out a spot for a proper quantity and developing with the mixed solvent of benzene:chloroform:acetic acid (50:20:0.5 (v/v)) (Product made from YATORON) It analyzed. A result is shown in Table 1.

[0026]

[Table 1]

原料チヌ油	C6	C8	C10	C12	C18:1	C18:2	
(カプリン酸)	(カプリン酸)	(カプリン酸)	(ラウリン酸)	(ステアリン酸)	(リノール酸)	(アラキドン酸)	
脂肪酸組成(%)							
6:0	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
8:0	ND	ND	20.1	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	ND	ND	20.8	ND	ND	ND
12:0	ND	ND	ND	ND	10.5	ND	ND
16:0	18.5	17.6	12.9	12.6	15.2	12.7	11.7
16:1	4.7	4.2	2.9	2.8	3.9	2.9	2.7
18:0	5.2	4.6	2.0	2.3	3.3	3.1	2.4
18:1(n-7)	17.2	15.5	7.8	8.4	12.8	31.3	9.3
18:2(n-6)	1.3	1.2	0.7	0.8	1.0	1.2	28.3
20:4(n-6)	2.5	2.8	2.4	2.7	2.6	2.5	2.4
20:5(n-3, EPA)	5.8	6.4	5.0	6.0	6.1	5.7	5.4
22:6(n-3, DHA)	23.3	26.2	32.3	29.7	27.9	25.8	25.4
トリグリセリド組成(%)							
TG(トリグリセリド)	100	96.6	90.3	91.2	93.2	93.4	94.7
DG(ジグリセリド)	ND	2.3	6.4	6.8	5.3	4.2	4.9
MG(モノグリセリド)	ND	1.1	3.4	2.0	1.5	2.4	0.4

ND ; 検出されず

[0027] As for the fatty acid which carries out an ester interchange in order to condense a higher unsaturated fatty acid, especially DHA, it is desirable as above-mentioned that it is 12 medium chain fatty acid from a carbon number 6. Especially, a carbon number 8 and ten medium chain fatty acid had the very good concentration efficiency of DHA, and as a result of carrying out an ester interchange to a carbon number 8 and ten medium chain fatty acid, both the concentration of DHA reached to about 30%. When an ester interchange was carried out by caprylic acid of eight carbon numbers, the recovery of the glyceride fraction was 68.9% (weight %), and when it was converted into mole %, it was 92.9%.

[0028] In addition, although this higher unsaturated fatty acid concentration glyceride was kept for one month in the 5-degree C refrigerator, the deposit of a crystal was not seen at all. By introducing caprylic acid into a tuna oil, the fats and oils which bloom does not produce not only in concentration of DHA but in a 5-degree C storage examination were able to be manufactured. Moreover, since the peak of DHA was not detected as a result of measuring the fatty acid composition in the fatty acid fraction removed all over the water layer by the alkali deoxidizing method, it has also checked that there was almost no loss into the fatty acid fraction of DHA.

[0029] [Work example 2] Tuna oil (saponification value: 184.5, EPA:5.8%, DHA:23.3%) [ 100 g ] One 100g kind in 12 medium chain fatty acid and oleic acid, and linolic acid is added from a carbon number 6. Rhizopus delemar (Rhizopus delemar) fixed by the ceramic carrier (NGK Insulators, Ltd. make; SM-10) Lipase (Tanabe Seiyaku Co., Ltd. make; TARIPAZE 20,000 U/g) 5g and 2.5ml of distilled water -- in addition -- while shaking by a part for 130 round-trip/ The ester exchange reaction was performed at 30 degrees C for 24 hours.

[0030] The cocktail after an ester exchange reaction had reached the equilibrium enough. After the reaction, since immobilized enzyme sedimented promptly, it was able to collect only the oil of the supernatant liquid and was able to obtain the higher unsaturated fatty acid concentration fats and oils which have the fatty acid composition of the following table 2 by the same method as a work example 1. In addition, the method of fats-and-oils analysis was performed by the same method as a work example 1. A result is shown in Table 2.

[0031]

[Table 2]

原料マカ油	C8	C8	C10	C12	C18:1	C18:2	
	(カロン酸)	(カリン酸)	(カリン酸)	(カリン酸)	(カリン酸)	(カリン酸)	(カリン酸)
<b>脂肪酸組成(%)</b>							
6:0	ND	2.2	ND	ND	ND	ND	ND
8:0	ND	ND	19.1	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	ND	ND	20.6	ND	ND	ND
12:0	ND	ND	ND	ND	10.1	ND	ND
16:0	18.5	17.5	12.9	12.8	15.8	13.0	11.9
16:1	4.7	4.1	2.6	3.0	3.5	2.8	2.5
18:0	5.2	4.3	1.9	2.4	3.0	3.0	2.7
18:1(n-9)	17.2	15.7	8.2	8.8	13.3	31.7	9.8
18:2(n-6)	1.3	1.2	0.8	0.7	1.2	1.0	29.1
20:4(n-6)	2.5	2.4	2.4	2.5	2.8	2.8	2.4
20:5(n-3)	5.8	6.5	4.9	5.7	5.9	5.6	5.3
22:6(n-3)	23.3	26.1	31.9	29.9	27.5	25.4	24.9
<b>脂肪酸組成(%)</b>							
TC	100	96.6	90.3	91.2	93.2	93.4	94.7
DC	ND	2.3	6.4	6.8	5.3	4.2	4.9
MC	ND	1.1	3.4	2.0	1.5	2.4	0.4

ND ; 検出されず

[0032] [Work example 3] Tuna oil (saponification value: 184.5, EPA:5.8%, DHA:23.3%) [ 100 g ] One 100g kind in 12 medium chain fatty acid and oleic acid, and linolic acid is added from a carbon number 6. Rhizopus delemar (Rhizopus delemar) fixed by the ceramic carrier (NGK Insulators, Ltd. make; SM-10) by the same method as a work example 2 Lipase (Tanabe Seiyaku Co., Ltd. make; TARIPAZE 20,000 U/g) 5g and 2.5ml of distilled water -- in addition, While shaking by a part for 130 round-trip/ The ester exchange reaction was performed at 30 degrees C for 24 hours. After the reaction, since immobilized enzyme sedimented promptly, after it put the cocktail gently for a while, it removed only the oil of the supernatant liquid, and collected immobilized enzyme.

[0033] 100g of tuna oils, a carbon number 8, or 100g of ten fatty acid was added to this immobilized enzyme, and the ester exchange reaction was performed again. The ester exchange reaction was repeated 30 times by such a method. Each mixture after performing a repetition reaction had reached the equilibrium enough. The glyceride presentation in each cocktail after performing a repetition reaction to below, and fatty acid composition are shown (Table 3). In addition, the method of fats-and-oils analysis is the same as that of a work example 1.

[0034]

[Table 3]

	C8(カプリル酸)							C10(カプリン酸)						
回数	未処理 (マゴ油)	1	2	3	4	5	30	未処理 (マゴ油)	1	2	3	4	5	30
グリセリド 組成(%)														
TG	100	90.3	93.7	95.2	99.3	99.3	99.5	100	91.6	92.9	92.7	99.5	99.3	99.6
DG	ND	6.4	5.5	4.3	0.7	0.7	0.5	ND	6.3	5.4	5.6	0.5	0.7	0.4
MG	ND	3.4	0.7	1.5	ND	ND	ND	ND	2.1	1.7	1.7	ND	ND	ND
脂肪酸組成(%)														
8:0	ND	20.1	22.4	23.2	21.6	20.7	20.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20.8	20.9	19.1	20.2	18.9	20.1
16:0	18.5	12.9	13.2	12.9	13.3	13.4	13.3	18.5	12.6	13.2	13.0	13.4	13.2	13.5
16:1	4.7	2.9	3.0	2.9	3.0	3.0	2.9	4.7	2.8	2.9	2.9	2.8	2.9	2.8
18:0	5.2	2.0	2.0	2.0	2.2	2.2	2.1	5.2	2.3	2.4	2.3	2.5	2.3	2.4
18:1	17.2	7.8	8.3	8.0	8.4	8.5	8.3	17.2	8.4	9.1	9.2	9.0	8.8	9.0
18:2	1.3	1.3	0.7	0.7	1.4	1.4	1.2	1.3	0.8	0.5	0.7	0.9	1.1	1.0
20:4	2.5	2.4	2.2	2.3	2.4	2.4	2.2	2.5	2.7	2.5	2.5	2.8	2.7	2.5
20:5	5.8	5.0	4.7	4.8	5.2	5.3	4.9	5.8	6.0	5.5	5.8	5.3	5.5	5.8
22:6	23.3	32.3	32.0	31.1	30.5	30.2	30.1	23.3	29.7	29.7	29.2	29.0	28.9	29.1

[0035] When the content of the triglyceride contained in fats and oils by performing a repetition reaction as above-mentioned rose gradually and performed four repetition reactions or more, it turned out that the higher unsaturated fatty acid concentration fats and oils containing 99% or more of triglyceride are obtained. For example, when caprylic acid (Table 3, C8) was used for the ester interchange, and immobilized enzyme was repeated 30 times and used 5 times 4 times, they were 99.3%, 99.3%, and 99.5%, respectively. In this case, the contents of the higher unsaturated fatty acid (DHA; "22:6" of the fatty acid composition of Table 3) were 30.5%, 30.2%, and 30.1% in the 30th treatment 4 times and 5 times, respectively. It is the same result even when capric acid (Table 3, C10) is used for an ester interchange.

[0036] The 4th reaction The obtained oil at the reaction exchanged by caprylic acid of eight carbon numbers 70.2g, It is 73.1g by the reaction exchanged by capric acid of ten carbon numbers. It was, and since the mole recoveries of glyceride were 91.3% and 90.8%, respectively, this ester exchange reaction showed that most hydrolyses had not taken place. In addition, even if it used immobilized enzyme, having repeated it 30 times, the fall of enzyme activity was not accepted at all.

[0037]

[Effect of the Invention] The fats and oils which contain the triglyceride which contains a higher unsaturated fatty acid in high concentration by this invention can be manufactured. Since it can be broadly used for drugs, a biochemistry reagent, food, etc. that the higher unsaturated fatty acid concentration triglyceride which has various bioactive operations can be efficiently

condensed with a sufficient recovery, this invention is very useful industrially.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-214891

(43) 公開日 平成8年(1996)8月27日

(51) Int.Cl. <sup>a</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P	7/64		C 1 2 P	7/64
C 1 1 C	3/08		C 1 1 C	3/08
	3/10			3/10

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平7-29745	(71) 出願人	591030499 大阪市 大阪府大阪市北区中之島1-3-20
(22) 出願日	平成7年(1995)2月17日	(71) 出願人	000003274 マルハ株式会社 東京都千代田区大手町1丁目1番2号
		(72) 発明者	富永 嘉男 大阪府大阪市西淀川区歌島二丁目7番2号
		(72) 発明者	杉原 耿雄 兵庫県伊丹市千僧六丁目87番地
		(72) 発明者	島田 裕司 大阪府堺市堺区東四丁2番31号
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法

(57) 【要約】

【構成】 油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみに作用するリパーゼを作用させることを特徴とする高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法、並びに、油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみに作用する固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得るとともに該反応混合物中から固定化酵素を回収し、油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で前記回収した固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得ることを繰り返すことを特徴とする油脂の製造方法。

【効果】 本発明により、高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有するトリグリセリドを含む油脂が得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみに作用するリパーゼを作用させることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

【請求項2】 油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみに作用する固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得るとともに該反応混合物中から固定化酵素を回収し、次に、新たに油脂及び中鎖脂肪酸を加え、該油脂及び該中鎖脂肪酸の存在下で前記回収した固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得る工程を繰り返すことにより、高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを95%以上含有する油脂を得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

【請求項3】 中鎖脂肪酸が、炭素数6~12個を有する脂肪酸から選ばれるものである請求項1記載の高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

【請求項4】 炭素数6~12個を有する中鎖脂肪酸が、カプリル酸又はカプリン酸である請求項3記載の高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

【請求項5】 高度不飽和脂肪酸が、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸若しくはエイコサペンタエン酸又はこれらの組合せである請求項1記載の高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

【請求項6】 油脂が、魚油、オキアミ、藻類又は菌類から抽出したものである請求項1記載の高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有するトリグリセリドの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、高度不飽和脂肪酸の有する生理活性が注目されている。特に、エイコサペンタエン酸（以下「EPA」と称する）やドコサヘキサエン酸（以下「DHA」と称する）は、動脈硬化症、血栓症などの成人病に対する予防効果や制ガン作用、学習能の増強作用など多くの生理活性作用を有していることが知られている。そして、EPA、DHAの医薬品、特定保健用食品への利用法について様々な検討がなされている。

【0003】 EPAやDHAを主体とした高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法としては、例えば（1）クロマトグラフによる方法、（2）液-液分配による方法、（3）真空精密蒸留による方法、（4）二重結合への付加物による方法、及びこれらを組合わせた方法が知られている（佃 信夫：食品工業、9下、30（1985））。しかし、これらの方法により高度不飽和脂肪酸を濃縮するには、油脂を脂肪酸に変換するか、そのアルカリ金属塩又は低級アルコ

ール等に変換する必要がある、これらを食品用に供することはできない。

【0004】 食品用に供することができるグリセリドの形態で高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法としては、極低温溶剤分別法（ウインタリゼーション）（佃 信夫：食品工業、9下、30（1985））やリパーゼを用いた選択的加水分解法（特公平4-16519号公報）が知られている。しかし、極低温溶剤分別法では極適温（-30~-50℃）で結晶化及び濾過する必要がある、しかも溶剤を除去しなければならず、工程が煩雑である。また、極低温溶剤分別法では、EPAの豊富なイワシ油（EPA含量8~16%）を原料油として用いたとき、EPAの最大濃縮率は30%であり、DHAの豊富なマグロあるいはカツオ眼窩油（DHA含量25~30%）を原料としたとき、DHAの最大濃縮率は35%である。

【0005】 このように、EPA、DHA等を極低温溶剤分別法によって高濃度に濃縮する場合は、得られる高度不飽和脂肪酸グリセリドの収率が15%以下と低く、生産コストが極めて高くなるという問題点がある。また、リパーゼの選択的加水分解反応を利用した方法、即ち、キャンディダ・シリンドラシェ（*Candida cylindracea*）が生産するリパーゼを使用して魚油を加水分解し、グリセリド中に高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法（特公平4-16519号公報）を用いる場合は、DHA濃度は50~55%まで濃縮できるが、EPAは濃縮できないという不便がある。しかも、加水分解を受けにくいDHAでさえも、反応が平衡に達した時点で、反応前のDHA量の30~35%を遊離脂肪酸として損失してしまう。さらに、グリセリドの回収率も30~35%とかなり低く、融点の高いジグリセリドが副生するという問題点もある。

【0006】 従って、従来より、DHA等の高度不飽和脂肪酸の損失を少なくし、ジグリセリドを副生することなく高度不飽和脂肪酸を高濃度に含むトリグリセリドを製造する方法が要望されている。これまでに、トリグリセリドの1,3-位特異的リパーゼによるエステル交換反応を利用し、炭素数8から14個の中鎖脂肪酸で構成されている油脂と炭素数18個以上の脂肪酸であるリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、EPA、DHAを原料として、トリグリセリドの2-位に中鎖脂肪酸を、1,3-位に炭素数18個以上の脂肪酸を含有する油脂の製造方法が知られている。（特開昭63-27988号公報）。

【0007】 また、1,3-位特異的リパーゼを用いたエステル交換反応を利用して、魚油とオレイン酸を原料とし、1,3-位にオレイン酸を含有し、2-位にDHAを含有するトリグリセリドの製造方法も知られている（特開平6-587594号公報）。しかし、特開平6-587594号公報記載の方法では、エステル交換に用いるオレイン酸が魚油の構成脂肪酸の平均分子量に相当するため、グリセリド中のDHA含量（重量%）を高めることはできず、また、生成油脂中のトリグリセリド含量は約90%であり、

あまり高いものではない。また、特開昭63-27988号公報記載の方法では、DHAを十分に濃縮することができないという問題点がある。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高度不飽和脂肪酸含量(重量%)を高めたトリグリセリドを含む油脂の製造方法を提供することを目的とする。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、トリグリセリドの1, 3一位を構成している長鎖脂肪酸を中鎖脂肪酸にエステル交換することで、2一位に存在している高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有するグリセリドを製造することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1, 3一位のエステル結合にのみ作用するリパーゼを作用させることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法である。

【0010】さらに、本発明は、油脂及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1, 3一位のエステル結合にのみ作用する固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得るとともに該反応混合物中から固定化酵素を回収し、次に、新たに油脂及び中鎖脂肪酸を加え、該油脂及び該中鎖脂肪酸の存在下で前記回収した固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得る工程を繰り返す行うことにより、高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを95%以上含有する油脂を得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを含む油脂の製造方法である。

【0011】ここで、中鎖脂肪酸としては、炭素数6～12個を有する脂肪酸から選ばれるものであり、例えば、カプリル酸又はカプリン酸等が挙げられ、高度不飽和脂肪酸としては、例えば、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸若しくはエイコサペンタエン酸又はこれらの組合せが挙げられ、油脂としては、例えば、魚油、オキアミ、藻類又は菌類から抽出したものが挙げられる。

#### 【0012】以下、本発明を詳細に説明する

本発明は、油脂のトリグリセリドの1, 3一位を構成する長鎖脂肪酸を中鎖脂肪酸にエステル交換することで、2一位に存在する高度不飽和脂肪酸の含有比率を高め、該高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有せしめたトリグリセリドを製造する方法である。すなわち、本発明は、油脂、炭素数6から12個の脂肪酸の中から選択される一種類以上の中鎖脂肪酸及び微量の水を原料とし、1, 3一位特異的リパーゼを作用させてエステル交換反応を行い、トリグリセリド中の2一位に多く含まれるDHA、EPAなどの高度不飽和脂肪酸をトリグリセリドの型で効率良く回収し、高度不飽和脂肪酸濃度を高めたトリグリセリドを製造する方法である。

【0013】原料油脂のトリグリセリドを構成する脂肪

酸の平均分子量は、炭素数18の脂肪酸の分子量に相当する。本発明では、トリグリセリドの1, 3一位を構成する長鎖脂肪酸を、中鎖脂肪酸にエステル交換して1, 3一位に存在する脂肪酸の分子量を小さくすることにより、2一位に存在する高度不飽和脂肪酸の濃度を高めることができる。エステル交換に用いる中鎖脂肪酸としては、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸であるのが好ましく、炭素数8から10個の中鎖脂肪酸がさらに好ましい。

【0014】本発明において、油脂とは、構成脂肪酸に高度不飽和脂肪酸を含有するトリグリセリドを意味する。高度不飽和脂肪酸含有油脂としては、たとえばマグロ、カツオ、イワシ、サバ、サンマ、タラ、イカ、アジ等の魚油の他、オキアミ、さらに、クロレラ、スピルリナ等の藻類、モルティエラ属等の菌類から抽出した油脂を挙げることができる。また、高度不飽和脂肪酸としては、例えば、アラキドン酸、DHA若しくはEPA又はこれらの組合せ等が挙げられる。

【0015】本発明で用いることのできるリパーゼとしては、例えば、リゾプス(Rhizopus)属、リゾムコール(Rhizomucor)属、アスペルギルス(Aspergillus)属などの微生物が生産するもの、ブタ膵臓リパーゼなどが挙げられる。かかるリパーゼについては、市販のものをを用いることができる。例えば、リゾプス・デレマー(Rhizopus delemar)のリパーゼ(田辺製薬(株)製、タリパーゼ)、リゾムコール・ミイヘイ(Rhizomucor miehei)のリパーゼ(ノボ・ノルディスク(株)社製; リボザイムIM)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)のリパーゼ(天野製薬(株); リパーゼA)等が挙げられる。

【0016】上記のリパーゼの使用形態はそのまま用いても良く、また、セライトやイオン交換樹脂、セラミックス担体などに固定されたリパーゼを用いてもよい。本反応系に加える水分量は極めて重要で、水を含まない場合はエステル交換が進行しにくくなり、また、水分量が多い場合は加水分解が起こり、グリセリドの回収率が低下する。従って、固定化酵素を用いたときの水分量は、加えた酵素量の0～1,000%(重量%)、好ましくは10～500%(重量%)であり、セライト又はセラミックス担体に固定したリゾプス・デレマー(Rhizopus delemar)のリパーゼ(田辺製薬(株)製、タリパーゼ)を用いた時の水分量は、加えた酵素量の10～100%(重量%)である。

【0017】リパーゼの使用量は反応条件によって適宜決定すれば良く、特に制限されるものではないが、例えばセライトやセラミックス担体に固定化したリゾプス・デレマーのリパーゼを用いたときは、反応混液の2.5～10%(重量%)が適量である。エステル交換反応は、以下の方法により行う。すなわち、上記魚油等に、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸、及びオレイン酸又はリノール酸の一種を加える。これに適当な量(通常10,000～30,0

00U/g) のリパーゼ及び蒸留水を加え、攪拌しながら10～70時間行えばよい。このときの反応温度は20～40℃である。

【0018】本発明で製造する反応後のトリグリセリドは、高度不飽和脂肪酸が高濃度に濃縮されたトリグリセリドであり、該トリグリセリドと、過剰の中鎖脂肪酸及びエステル交換されて生じた油脂（例えば魚油）の1,3一位を構成する脂肪酸との混合物として存在している。そこで、高度不飽和脂肪酸が高濃度に濃縮されたトリグリセリド（以下「高度不飽和脂肪酸濃縮トリグリセリド」という）の精製は、アルカリ脱酸、水蒸気蒸留、分子蒸留、真空精密蒸留、カラムクロマトグラフィー、溶剤抽出のいずれか又はこれらを組み合わせることにより、上記のエステル交換された脂肪酸及び過剰の中鎖脂肪酸を除去することによって行うことができる。

【0019】また、上記エステル交換反応を繰り返して行うことにより、高度不飽和脂肪酸濃縮トリグリセリドの含量を、高濃度（95%以上）に高めることができる。すなわち、中鎖脂肪酸の存在下に、トリグリセリドの1,3一位のエステル結合にのみ作用するリパーゼを油脂に作用させて、1,3一位の脂肪酸が中鎖脂肪酸とエステル交換された反応溶液を得る。

【0020】次に、該反応溶液から固定化酵素（固定化リパーゼ）を回収し、次に、新たに油脂及び中鎖脂肪酸を加え（水を加えない）、該油脂及び該中鎖脂肪酸の存在下で前記固定化リパーゼを作用させて反応混合物を得る。反応回数が少ない場合（例えば1～2回等）は、得られる油脂のトリグリセリド含量は90%前後であるが、固定化酵素を用いて繰り返し反応を行うことにより、高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを95%以上含有する油脂が得られる。

【0021】従来の技術では、油脂中のトリグリセリド含量は約90%とあまり高いものではなかったのに対し、本発明では、固定化酵素を繰り返し使用しても活性が落ちることなく、その活性は維持され、高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを95%以上（多くは99%以上）含有する油脂が得られるものである。高度不飽和脂肪酸高含有トリグリセリドを95%以上含有する油脂を得るための上記工程の反応回数は特に限定されず、リパーゼが失活し、エステル交換能が低下しない限り繰り返すことが

可能である。例えば、本発明の条件下では、3～150回繰り返すことができる。

【0022】反応に用いる酵素、反応条件については、前記と同様である。本発明で製造した高度不飽和脂肪酸濃縮トリグリセリドは、例えば、魚油の2一位に多く含有するDHAをまったく遊離しないため、DHAの回収率が極めて良いということが特徴に挙げられる。さらに、本発明で提起した方法を用いると原料油脂の加水分解はほとんど起こらず、エステル交換反応のみ進行するため、油脂の回収率も極めて高いという特徴も挙げられる。

【0023】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例に限定されない。

【実施例1】マクロ油（ケン化価：184.5，EPA：5.8%，DHA：23.3%）100gに、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸、および、オレイン酸又はリノール酸のうちの一種類を100g加えて、セライト545（和光純薬工業（株）製）で固定化したリゾプス・デレマー（*Rhizopus dele mar*）のリパーゼ（田辺製薬（株）製、タリパーゼ 15,000U/g）5g、蒸留水2.5mlを加えて、500rpmで攪拌しながら30℃で16時間エステル交換反応を行った。

【0024】エステル交換反応後の反応混液は、十分平衡に達していた。次いで、該反応混液からエステル交換されて生じた魚油由来の遊離脂肪酸及び交換されなかった過剰の中鎖脂肪酸をアルカリ脱酸法によって水層に除去することによって、下記の通り高度不飽和脂肪酸濃縮グリセリドを得ることができた。なお、得られたグリセリド中の脂肪酸組成は、常法に従ってメチルエステル化した後、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーにより分析した。

【0025】また、グリセリド組成については、クロマトットS-III（株）ヤترون製）に試料を適量スポットし、ベンゼン：クロロホルム：酢酸（50：20：0.5(v/v)）の混合溶媒で展開した後、イヤトロスキャンTH-10（株）ヤترون製）で分析を行った。結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

原料マグロ油 C6 C8 C10 C12 C18:1 C18:2  
(カプリル酸)(カプリン酸)(デカリン酸)(ドデカリン酸)(ヘキサデカリン酸)(オクタデカリン酸)

## 脂肪酸組成(%)

6:0	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
8:0	ND	ND	20.1	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	ND	ND	20.8	ND	ND	ND
12:0	ND	ND	ND	ND	10.5	ND	ND
16:0	18.5	17.6	12.9	12.6	15.2	12.7	11.7
16:1	4.7	4.2	2.9	2.8	3.9	2.9	2.7
18:0	5.2	4.6	2.0	2.3	3.3	3.1	2.4
18:1(n-7)	17.2	15.5	7.8	8.4	12.8	31.3	9.3
18:2(n-6)	1.3	1.2	0.7	0.8	1.0	1.2	28.3
20:4(n-6)	2.5	2.8	2.4	2.7	2.6	2.5	2.4
20:5(n-3, EPA)	5.8	6.4	5.0	6.0	6.1	5.7	5.4
22:6(n-3, DHA)	23.3	26.2	32.3	29.7	27.9	25.8	25.4

## グリセリド組成(%)

TG(トリグリセリド)	100	96.6	90.3	91.2	93.2	93.4	94.7
DG(ジグリセリド)	ND	2.3	6.4	6.8	5.3	4.2	4.9
MG(モノグリセリド)	ND	1.1	3.4	2.0	1.5	2.4	0.4

ND; 検出されず

【0027】上記の通り、高度不飽和脂肪酸、特にDHAを濃縮するためにエステル交換する脂肪酸は、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸であることが好ましい。中でも、炭素数8および10個の中鎖脂肪酸はDHAの濃縮効率が極めて良く、炭素数8および10個の中鎖脂肪酸にエステル交換した結果、DHAの濃度はともに約30%に達した。炭素数8個のカプリル酸でエステル交換した場合、グリセリド画分の回収率は68.9%（重量%）であり、モル%に換算すると92.9%であった。

【0028】なお、この高度不飽和脂肪酸濃縮グリセリドを5℃の冷蔵庫に一月保管したが、結晶の析出はまったく見られなかった。カプリル酸をマグロ油中に導入することにより、DHAの濃縮のみならず、5℃の保管試験においても曇りの生じない油脂を製造することができた。また、アルカリ脱酸法により水層中に除去した脂肪酸画分中の脂肪酸組成を測定した結果、DHAのピークは検出されなかったため、DHAの脂肪酸画分中への損失はほとんどないことも確認できた。

【0029】〔実施例2〕マグロ油（ケン化価：184.5，EPA：5.8%，DHA：23.3%）100gに、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸及びオレイン酸、リノール酸のうち一種類を100g加えて、セラミックス担体（日本ガイシ（株）製；SM-10）で固定化したリゾプス・デレマー（*Rhizopus delemar*）のリパーゼ（田辺製薬（株）製；タリパーゼ20,000U/g）5g、蒸留水2.5mlを加えて、130往復/分で振盪しながら30℃で24時間エステル交換反応を行った。

【0030】エステル交換反応後の反応混液は、十分平衡に達していた。反応後、固定化酵素はすみやかに沈降するため、上澄みの油分のみを回収し、実施例1と同様の方法により、下記表2の脂肪酸組成を有する高度不飽和脂肪酸濃縮油脂を得ることができた。なお、油脂分析の方法は実施例1と同様の方法で行った。結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

原料マクロ油 C8 C8 C10 C12 C18:1 C18:2  
(カロン酸)(カロン酸)(カロン酸)(カロン酸)(カロン酸)(カロン酸)

## 脂肪酸組成(%)

6:0	ND	2.2	ND	ND	ND	ND	ND
8:0	ND	ND	19.1	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	ND	ND	20.6	ND	ND	ND
12:0	ND	ND	ND	ND	10.1	ND	ND
16:0	18.5	17.5	12.9	12.8	15.8	13.0	11.9
16:1	4.7	4.1	2.6	3.0	3.5	2.8	2.5
18:0	5.2	4.3	1.9	2.4	3.0	3.0	2.7
18:1(n-9)	17.2	15.7	8.2	8.8	13.3	31.7	9.8
18:2(n-6)	1.3	1.2	0.8	0.7	1.2	1.0	23.1
20:4(n-6)	2.5	2.4	2.4	2.5	2.8	2.8	2.4
20:5(n-3)	5.8	6.5	4.9	5.7	5.9	5.6	5.3
22:6(n-3)	23.3	26.1	31.9	29.9	27.5	25.4	24.9

## グリセリド組成(%)

TC	100	96.6	90.3	91.2	93.2	93.4	94.7
DC	ND	2.3	6.4	6.8	5.3	4.2	4.9
MC	ND	1.1	3.4	2.0	1.5	2.4	0.4

ND; 検出されず

【0032】(実施例3) マクロ油(ケン化価:184.5, EPA:5.8%, DHA:23.3%) 100gに、炭素数6から12個の中鎖脂肪酸及びオレイン酸、リノール酸のうちの一種類を100g加えて、実施例2と同じ方法でセラミックス担体(日本ガイシ(株)製; SM-10)で固定化したリゾプス・デレマー(*Rhizopus delemar*)のリパーゼ(田辺製薬(株)製; タリパーゼ 20,000U/g) 5g、蒸留水2.5mlを加えて、130往復/分で振盪しながら30℃で24時間エステル交換反応を行った。反応後、固定化酵素はすみやかに沈降するため、反応混液をしばらく静置してから上澄みの油分のみを除去し、固定化酵素を回収

した。

【0033】この固定化酵素にマクロ油100g、炭素数8又は10個の脂肪酸100gを加え、再びエステル交換反応を行った。このような方法でエステル交換反応を30回繰り返した。繰り返し反応を行った後の各混液は、十分平衡に達していた。以下に、繰り返し反応を行った後の各反応混液中のグリセリド組成および脂肪酸組成を示す(表3)。なお、油脂分析の方法は実施例1と同様である。

【0034】

【表3】

回数	C8(カプリル酸)								C10(カプリン酸)							
	繰り返し処理								繰り返し処理							
	未処理 (マゴ油)	1	2	3	4	5	30		未処理 (マゴ油)	1	2	3	4	5	30	
リセリド組成(%)																
TC	100	90.3	93.7	95.2	99.3	99.3	99.5		100	91.6	92.9	92.7	99.5	99.3	99.6	
DG	ND	6.4	5.5	4.3	0.7	0.7	0.5		ND	6.3	5.4	5.6	0.5	0.7	0.4	
MG	ND	3.4	0.7	1.5	ND	ND	ND		ND	2.1	1.7	1.7	ND	ND	ND	
脂肪酸組成(%)																
8:0	ND	20.1	22.4	23.2	21.6	20.7	20.9		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	20.8	20.9	19.1	20.2	18.9	20.1	
16:0	18.5	12.9	13.2	12.9	13.3	13.4	13.3		18.5	12.6	13.2	13.0	13.4	13.2	13.5	
16:1	4.7	2.9	3.0	2.9	3.0	3.0	2.9		4.7	2.8	2.9	2.9	2.8	2.9	2.8	
18:0	5.2	2.0	2.0	2.0	2.2	2.2	2.1		5.2	2.3	2.4	2.3	2.5	2.3	2.4	
18:1	17.2	7.8	8.3	8.0	8.4	8.5	8.3		17.2	8.4	9.1	9.2	9.0	8.8	9.0	
18:2	1.3	1.3	0.7	0.7	1.4	1.4	1.2		1.3	0.8	0.5	0.7	0.9	1.1	1.0	
20:4	2.5	2.4	2.2	2.3	2.4	2.4	2.2		2.5	2.7	2.5	2.5	2.8	2.7	2.5	
20:5	5.8	5.0	4.7	4.8	5.2	5.3	4.9		5.8	6.0	5.5	5.8	5.3	5.5	5.8	
22:6	23.3	32.3	32.0	31.1	30.5	30.2	30.1		23.3	29.7	29.7	29.2	29.0	28.9	29.1	

【0035】上記の通り、繰り返し反応を行うことによって、油脂中に含まれるトリグリセリドの含量が徐々に上昇し、4回以上の繰り返し反応を行うと、99%以上のトリグリセリドを含む高度不飽和脂肪酸濃縮油脂が得られることがわかった。例えば、カプリル酸（表3、C8）をエステル交換に使用し、固定化酵素を4回、5回、30回繰り返し使用したとき、それぞれ99.3%、99.3%、99.5%であった。この場合、高度不飽和脂肪酸（DH A；表3の脂肪酸組成の「22:6」）の含量は、4回、5回、30回目の処理でそれぞれ30.5%、30.2%、30.1%であった。カプリン酸（表3、C10）をエステル交換に用いた場合でも同様の結果である。

【0036】4回目の反応によって得られた油は、炭素数8個のカプリル酸で交換した反応で70.2g、炭素数10\*

\*個のカプリン酸で交換した反応で73.1gであり、グリセリドのモル回収率はそれぞれ91.3%、90.8%であったことから、このエステル交換反応によって加水分解はほとんど起こっていないことがわかった。なお、固定化酵素を30回繰り返し使用しても、酵素活性の低下はまったく認められなかった。

#### 【0037】

【発明の効果】本発明により、高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有するトリグリセリドを含む油脂を製造することができる。種々の生理活性作用を有する高度不飽和脂肪酸濃縮トリグリセリドを回収率よく効率的に濃縮できることは、医薬品、生化学試薬、食品等に幅広く利用することが可能なことから、本発明は、産業上極めて有用である。

フロントページの続き

(72)発明者 丸山 一輝  
茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社  
社中央研究所内

(72)発明者 椎名 智香子  
茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社  
社中央研究所内

(72)発明者 中山 秀  
茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社  
社中央研究所内